

Recherches  
sur le  
“PHÉNOMÈNE de ZONE ou PARADOXAL”  
dans diverses réactions biologiques,  
en particulier la précipitation spécifique  
(Réaction d'Uhlenhuth en Médecine Légale)

---

**T H E S E**

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

*et soutenue publiquement le 5 Décembre 1928*

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

PAR

**Louis BRUN**

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

*Ancien externe des Hôpitaux, diplômé de Bactériologie et Hygiène*

Né le 24 Mai 1904 à LA SAULCE (Hte-Alpes)



LYON

Imprimerie BOSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

---

1928



**Recherches sur le “Phénomène de Zone ou Paradoxal”**  
**dans diverses réactions biologiques,**  
**en particulier la précipitation spécifique**  
**(Réaction d'Uhlenhuth en Médecine Légale)**



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

Recherches  
sur le  
“PHÉNOMÈNE de ZONE ou PARADOXAL”  
dans diverses réactions biologiques,  
en particulier la précipitation spécifique  
(Réaction d'Uhlenhuth en Médecine Légale)

---

**THÈSE**

PRÉSENTÉE

à la FACULTÉ de MÉDECINE et de PHARMACIE de LYON

*et soutenue publiquement le 5 Décembre 1928*

**POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE**

PAR

**Louis BRUN**

*Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire*

*Ancien externe des Hôpitaux, diplômé de Bactériologie et Hygiène*

Né le 24 Mai 1904 à LA SAULCE (Hte-Alpes)



LYON

Imprimerie BCSC Frères & RIOU

42, Quai Gailleton, 42

---

1928

# PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire ..... M. L. HUGOUNENQ  
Doyen ..... M. J. LEPINE.  
Assesseur ..... M. ROLLET.

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, CAZENEUVE, ROQUE, BARD, LANNOIS.

## PROFESSEURS

|                                                           |                 |
|-----------------------------------------------------------|-----------------|
| Cliniques médicales .....                                 | MM. PIC.        |
| Cliniques chirurgicales .....                             | PAVIOT.         |
| Clinique obstétricale et Accouchements .....              | TIXIER.         |
| Clinique ophtalmologique .....                            | BERARD.         |
| Clinique des maladies cutanées et syphilitiques .....     | VORON.          |
| Clinique neurologique et psychiatrique .....              | ROLLET.         |
| Clinique des maladies des enfants .....                   | NICOLAS.        |
| Clinique des maladies des femmes .....                    | LEPINE (J.).    |
| Clinique d'oto-rhino-laryngologie .....                   | MOURQUAND.      |
| Clinique des maladies des voies urinaires .....           | VILLARD.        |
| Clinique chirurgicale, Infantile et orthopédie .....      | COLLET.         |
| Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie .....   | ROCHET.         |
| Chimie biologique et médicale .....                       | NOVE-JOSSERAND  |
| Chimie organique et Toxicologie .....                     | CLUZET.         |
| Matière médicale et Botanique .....                       | HUGOUNENQ.      |
| Parasitologie et Histoire naturelle médicale .....        | MOREL.          |
| Anatomie .....                                            | BRETIN.         |
| Histologie .....                                          | GUIART.         |
| Physiologie .....                                         | LATARJET.       |
| Pathologie interne .....                                  | POLICARD.       |
| Pathologie et Thérapeutiques générales .....              | DOYON.          |
| Anatomie pathologique .....                               | FROMENT.        |
| Chirurgie opératoire .....                                | CADE.           |
| Médecine expérimentale et comparée et bactériologie ..... | FAVRE.          |
| Médecine légale .....                                     | PATEL.          |
| Hygiène .....                                             | ARLOING (F.)    |
| Thérapeutique .....                                       | Etienne MARTIN. |
| Pharmacie .....                                           | COURMONT (P.).  |
| Hydrologie thérapeutique et climatologie .....            | SAVY.           |
|                                                           | LEUJER.         |
|                                                           | PIERY.          |

## PROFESSEURS TITULAIRES SANS CHAIRE

|                                               |             |
|-----------------------------------------------|-------------|
| Chargé d'un cours de Pathologie externe ..... | MM. VALLAS. |
| — — — Prépédeutique de gynécologie .....      | CONDAMIN.   |
| — — — Chimie minérale .....                   | BARRAL.     |
| — — — Urologie .....                          | GAYET.      |

## CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

|                                                      |                     |
|------------------------------------------------------|---------------------|
| Anatomie topographique .....                         | MM. THEVENOT (Léon, |
| Puériculture et hygiène de la première enfance ..... | RHENTER.            |
| Chirurgie expérimentale .....                        | TAVERNIER.          |
| Stomatologie .....                                   | TELLIER.            |

## AGREGES

|                |          |                   |                  |
|----------------|----------|-------------------|------------------|
| MM.            | MM.      | MM.               | MM.              |
| GARIN.         | ROUBIER. | CHALIER (André).  | DEVIC.           |
| TRILLAT.       | BONNET.  | CHALIER (Joseph). | GABRIELLE.       |
| SARVONAT.      | RHENTER. | NOEL.             | MANCEAU.         |
| FLORENCE (G.). | MAZEL.   | CHEVALLIER.       | MARTIN (Joseph). |
| ROCHAIX.       | SANTY.   | DUMAS.            | ROCHET (Ph.).    |
| CORDIER (V.).  | DUNET.   | DUFOURT.          | WERTHEIMER.      |
|                |          |                   | GATE.            |

M. BAYLE, secrétaire.

## EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. Etienne MARTIN, président ; COURMONT, assesseur ;  
ROCHAIX et GATE agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

A MA MÈRE, A MON PÈRE

En gage de profonde affection et  
de gratitude émue.

A MES FRÈRES

A MES AMIS

AU DOCTEUR JEAN CIBERT  
*Ancien interne des Hôpitaux*

Il nous a reçu dans ses conférences  
au début de nos études médicales.

Qu'il nous permette de lui rappeler  
ici notre reconnaissance pour  
toute la bienveillance, l'amitié même  
dont il a bien voulu nous honorer.

À MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. LE PROFESSEUR ETIENNE-MARTIN

*Professeur de Médecine légale à la Faculté de Médecine  
de Lyon*

*Secrétaire général des Congrès de Médecine légale  
de langue française*

*Chevalier de la Légion d'honneur*

Nous lui devons de nous avoir inspiré ce travail et l'honneur de le présider.

A M. LE PROFESSEUR PAUL COURMONT

*Professeur d'Hygiène à la Faculté de Médecine de Lyon  
Officier de la Légion d'honneur*

Ses leçons magistrales nous ont ouvert des horizons nouveaux et rendu plus aisée l'étude difficile des réactions biologiques.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ A. ROCHAIX

*Chevalier de la Légion d'honneur*

Pour lui, notre reconnaissance est infinie et notre mémoire gardera longtemps intact le souvenir de l'accueil favorable qu'il nous a réservé dans son laboratoire.

A M. LE MÉDECIN-COMMANDANT B. LE BOURDELLES  
*Professeur agrégé du Val-de-Grâce*  
*Chevalier de la Légion d'honneur*

Dont les conseils éclairés, maintes fois répétés, nous furent d'un secours particulièrement précieux pour la rédaction de ce travail.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GATE

Son accueil amical dans une circonstance pénible, nous a produit une profonde impression. Qu'il reçoive ici toute respectueuse reconnaissance.

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX DE LYON

*Années d'Externat :*

Ophtalmologie : PROFESSEUR ROLLET.  
Oto-Rhino-Laryngologie : DOCTEUR REBATTU.  
Urologie : PROFESSEUR AGRÉGÉ SANTY.  
Médecine générale : DOCTEUR GOYET.  
Gynécologie : PROFESSEUR VILLARD.  
Neurologie : DOCTEUR BERIEL.

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LYON  
ET DE L'ÉCOLE DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE

RECHERCHES SUR LE « PHÉNOMÈNE DE ZONE OU PARADOXAL »  
DANS DIVERSES RÉACTIONS BIOLOGIQUES,  
EN PARTICULIER LA PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE  
(RÉACTION D'UHLENHUTH EN MÉDECINE LÉGALE)

---

CHAPITRE PREMIER

---

Introduction

---

Depuis que les phénomènes de précipitation spécifiques des filtrats de cultures microbiennes par le sérum correspondant ou des sérums antigènes par les antisérums, que les phénomènes d'agglutination microbienne spécifique sont connus, les biologistes et les bactériologistes ont noté maintes fois des résultats en apparence paradoxaux que l'on désigne en France sous le nom de « phénomène paradoxal » et dans les pays anglo-saxons de « phénomène de zone ».

Dans une réaction de précipitation, les mélanges à dilution faible (1 p. 10 par exemple) de sérum précipitant (sérum anti) et de sérum précipitable ou de filtrat de culture microbienne correspondante ne don-

ment pas de précipité alors que les mélanges à dilution forte (1 p. 100 ou 1 p. 1.000) donnent un précipité abondant.

Dans les réactions d'agglutination, ce sont, dans certains cas, les dilutions les plus étendues qui donnent un résultat positif alors que les dilutions plus faibles donnent un résultat négatif. Le vibrion cholérique, par exemple, peut ne pas être agglutiné à 1 p. 10, 1 p. 20, 1 p. 50, 1 p. 100, par un sérum anticholérique, mais il commence à l'être à 1 p. 200, il le sera encore davantage à 1 p. 500 et complètement à 1 p. 1.000, en un temps donné.

Ces faits avaient été notés depuis longtemps. Dans les livres classiques, dans les mémoires scientifiques on les trouve consignés, en passant, mais sans que les auteurs aient l'air de leur attacher quelque importance. Ils paraissent les considérer comme de simples curiosités.

Il nous a semblé que ce phénomène méritait d'être étudié de plus près.

Si dans la pratique des réactions d'agglutination le « phénomène paradoxal » peut ne pas présenter une importance bien grande pour le bactériologiste averti, celui qu'on peut observer dans les réactions de précipitation offre peut-être plus de dangers au point de vue des erreurs qui pourraient en découler. En médecine légale, par exemple, le « phénomène de zone » qu'on pourrait observer en pratiquant la réaction d'Uhlenhuth en vue de l'identification des taches de sang pourrait provoquer des erreurs à conséquences

graves. MM. ETIENNE-MARTIN et A. ROCHAIX ont attiré récemment l'attention sur ce point (1).

En rapprochant ce phénomène d'autres observés dans la déviation du complément, les réactions des mélanges toxine-antitoxine, les réactions entre colloïdes, on s'aperçoit qu'il n'est pas particulier à la précipitation et à l'agglutination et qu'il s'agit peut-être d'un phénomène général. Le rapprochement de ces faits en tout cas s'imposait pour essayer d'en tirer quelques conclusions.

Enfin, en essayant d'élucider le mécanisme du « phénomène de zone » on pourrait peut-être en prévoir l'apparition et en comprendre la signification.

C'est la tâche que nous avons entreprise avec l'aide bienveillante de MM. A. ROCHAIX et B. LE BOURDELLÈS. Malheureusement, la difficulté du sujet et l'obligation de présenter le travail à une date impossible à reculer, ne nous ont pas permis d'arriver jusqu'à une solution complète du problème. Nous pensons tout au moins avoir planté quelques jalons qui permettront à d'autres d'arriver avec succès à la fin de la tâche.

---

(1) Etienne-Martin et A. Rochaix. Sur le « Phénomène paradoxal » dans la réaction d'Uhlenhuth. *Annales de Méd. lég.*, janvier 1928, p. 47.



## CHAPITRE II

---

### Le "Phénomène de Zone" dans la Précipitation

---

La notion du rôle joué par l'élément quantitatif dans les résultats de la réaction de précipitation est ancienne. Et bien avant de songer à la qualité même du phénomène et à sa signification, il fallut introduire dans son étude les notions de poids et de mesure.

Déjà, BORDET (2) avait trouvé que la rapidité et l'importance de la réaction dépendent beaucoup des proportions des deux sérums que l'on met en présence; en général, il faut plus de sérum précipitant que de sérum précipitable. Ainsi pour le sérum qu'il étudiait en 1899 (sérum de lapin immunisé contre le sang de poule), BORDET trouve que les doses optimales étaient de 1 à 2 parties de sérum de poule pour 8 à 10 parties d'immunsérum. C'était là un premier pas dans le domaine de l'appréciation des doses de com-

plexes qui entrent en jeu, et un résultat approximatif peu rigoureux évidemment, mais dont l'indication est définitive quant au sens général de la réaction, ainsi que nous le verrons par la suite.

En 1901, L. CAMUS (5) dans un travail sur la production de la fibrinolyse et la démonstration de l'existence de la solubilisation de la fibrine, entrevoit le même phénomène. Pour résoudre la question complexe de l'histolyse, il recherche une substance simple et définie du plasma et le sérum sysant cette substance. Pour cela, il se servait de la fibrine d'une espèce animale qu'il injectait à une autre et déterminait chez le récepteur immunisé la formation d'un antisérum pour la substance qui avait servi à l'expérience. Ce n'est pas l'expérience elle-même qui nous apparaît intéressante, mais les remarques très précises qu'elle comporte.

« Je crois important, dit CAMUS, dans une note adjacente au rapport, d'attirer l'attention sur la façon de faire la réaction, car on pourrait, dans certaines conditions, méconnaître complètement une réaction positive. Il est toujours avantageux de mettre en contact une grande quantité de sérum de l'animal immunisé (précipitine de notre terminologie) avec une petite quantité du liquide à étudier (précipitogène). J'emploie habituellement un centimètre cube de sérum de l'animal immunisé pour 0 cm<sup>3</sup> 05 de solution de fibrine ou de sérum normal », et plus loin : « Si au lieu d'opérer comme je viens de l'indiquer, on renverse les proportions, c'est-à-dire si on prend 1 cm<sup>3</sup> de sérum de chien et 0 cm<sup>3</sup> 05 de sérum d'immunisé

on n'observe pas le plus léger louche même après 24 heures ».

Les remarques de CAMUS, ses indications sur la marche à suivre pour obtenir une bonne réaction de précipitation, nette, précise par le mélange d'un sérum et de son anti-sérum sont fondamentales. Pour la première fois, un auteur écrit sans ambiguïté aucune qu'un excès de sérum à précipiter (précipitogène) entrave, gêne l'action du sérum précipitant (précipitrine) et s'oppose à la précipitation.

Mais ce n'est pas assez. Le principe est posé, nettement établi, l'ordre des faits est irrémédiablement déterminé. Il manque cependant une estimation plus exacte des proportions à mettre en jeu des deux sérums antagonistes. Le mérite de montrer jusqu'à quelles valeurs extraordinairement réduites on pouvait pousser la quantité de sérum à précipiter sans faire disparaître son rôle évidemment essentiel pour l'obtention du phénomène, revient à LINOSSIER et LEMOINE (19). Avec ces auteurs, nous approchons la rigueur mathématique et l'énoncé sous une forme de rapports volumétriques des résultats qu'ils ont pu obtenir nous fait pleinement percevoir la sensibilité de leurs expériences à coup sûr définitives.

Dans une première note (25 janvier 1902), ces auteurs s'expriment ainsi : « Si on étudie les proportions des deux sérums qui entrent en réaction on constate qu'il est impossible de réaliser un mélange tel que les deux constituants du précipité albumineux disparaissent du liquide en se combinant : si dans une série de tubes on ajoute à un volume déterminé de sé-

rum précipitable dilué des quantités progressives de sérum actif et si après précipitation on étudie les propriétés du liquide décanté, on constate que dans les premiers tubes il existe un excès de substance précipitable; le liquide est troublé par une goutte de sérum actif et non par une goutte de sérum précipitable. Dans les tubes suivants qui ont reçu plus de sérum actif le liquide clair surnageant le précipité renferme à la fois un excès de précipitine et un excès de substance précipitable, si bien qu'il peut être également troublé par une goutte de sérum précipitable ou une goutte de sérum actif. Ce n'est que dans les derniers tubes où le sérum actif est en très grand excès que toute la substance précipitable paraît précipitée.

En d'autres termes, quand on met en contact de la précipitine et de la substance précipitable en proportions à peu près équivalentes, une partie seulement se sépare à l'état de combinaison insoluble. Entre les proportions des deux substances qui restent en dissolution dans le liquide, il s'établit un état d'équilibre qui peut être rompu par addition d'un excès soit de l'un soit de l'autre des corps réagissant. Une nouvelle précipitation est le résultat de cette rupture d'équilibre », et plus loin :

« Il résulte de cette constatation une conclusion pratique importante : c'est que, pour rechercher des traces d'albumine, il faut employer un grand excès de précipitine et réciproquement. Reste à apprécier quel doit être cet excès : sur ce point, nos appréciations ne sauraient avoir qu'un caractère contingent. En effet, les sérums actifs sont d'activité variable, et l'on ne

peut conclure légitimement de l'un à l'autre. Toutefois, nous pouvons dire que les sérums les plus riches en précipitine que nous ayons obtenus sont bien loin de séparer la substance précipitable du volume égal du sérum correspondant.

Pour donner par un chiffre une idée de leur pouvoir précipitant, 25 parties d'un sérum de lapin très actif vis-à-vis du sérum humain étaient tout à fait dépouillés de leur précipitine par une partie de sérum humain, tandis que 200 à 300 volumes de ce sérum actif étaient nécessaires pour insolubiliser complètement la substance précipitable d'un volume de sérum humain.

Pour transporter ces chiffres dans la pratique et en supposant que l'albumine à rechercher soit celle du sérum, il faudra pour être sûr de précipiter entièrement cette albumine ajouter au liquide dans lequel on la recherche une quantité de sérum actif égale à 3.000 à 4.000 fois le poids présumé de l'albumine. Pour rechercher la précipitine, il suffira au contraire d'ajouter au sérum actif,  $1/25^e$  de son poids de sérum précipitable, ou  $1/300^e$  d'albumine. »

Ce rappel est évidemment très long, mais nécessaire en raison de l'intérêt de ce travail et de sa priorité. Nous y voyons étudié points par points et développé avec une abondance de détails qui en rend la lecture excessivement aisée le phénomène de la précipitation avec la part respective prise par l'un et par l'autre constituants. Pour la première fois, en termes nets parce que définis en volumes et proportions numériques de telle sorte que notre esprit indécis puisse éta-

blir un raisonnement clair sur des données solides, nous avons l'interprétation du phénomène de la précipitation. Il serait dangereux d'oublier le texte sans fausser les résultats de ces deux auteurs : toujours nous aurons à nous souvenir que ces « appréciations ne sauraient avoir qu'un caractère contingent ».

Sur le terrain extraordinairement incertain et mouvant des réactions entre sérums, c'est évidemment là une rigueur suffisante.

A la suite de cette étude très poussée des interréactions dans les sérums précipitants, se dégage une notion définitive : un excès de sérum à précipiter — précipitogène — gêne la réaction et s'oppose à la formation du précipité. Le précipité est d'autant plus rapidement formé que le sérum précipitable est plus dilué et que le sérum précipitant est plus abondant. Il est à peu près exclusivement donné par le sérum précipitant. Cette action empêchante de l'antigène dont la connaissance et l'étude approximative sont donc de date ancienne a été rencontrée surtout au cours de recherches sur le phénomène de la précipitation et nommé ici « phénomène de zone », ailleurs « phénomène paradoxal », tantôt dans l'étude systématique de l'action du sérum précipitant sur le sérum à précipiter; tantôt, au contraire, sans recherche précise — et ce phénomène d'inhibition de la précipitation venait se greffer sur une expérience en cours troublant paradoxalement des résultats prévus et qu'on estimait devoir se faire dans un sens déterminé.

BALTHAZARD (1), dans sa thèse : Toxine et antitoxine typhiques (Paris 1903), étudiant les produits développés dans l'organisme du lapin à la suite d'injections intrapéritonéales de bouillon filtré de bacilles d'Eberth conclut à la formation d'une précipitine spécifique — et il ajoute : « C'est par le mélange de 10 gouttes de sérum et de 1 goutte de bouillon que le précipité est le plus abondant ».

Léonord MICHAELIS (21) (1903) note que l'action sur un sérum d'une précipitine spécifique peut être empêchée par divers agents. Toute solution d'albumine un peu concentrée ralentit la formation du précipité et en empêche même le dépôt si la masse qu'il devait former est un peu importante. Et surtout un excès de substance précipitable est capable d'empêcher la formation du précipité. Un excès de précipitine, au contraire, n'a aucune action sur la réaction.

OBERMAYER et E.-P. PICK (25) (1903) étudient la formation d'anticorps dans l'organisme du lapin par l'injection de sérum de bœuf. Ils rééditent en somme une expérience banale de précipitation et constatent eux aussi que le sérum de bœuf doit être convenablement dilué pour que la réaction soit nette et complète : trop concentré le sérum de bœuf est précipité incomplètement ou même pas du tout par l'immunsérum.

H. VALLÉE (Alfort) et NICOLAS (Toulouse) (34) (1903), au cours de recherches sur les séro-précipitines et sur les musculo-précipitines chez le bœuf remarquent que la réaction précipitante est d'autant plus nette que la dose de sérum employée se rapproche de la dose minima titrée à l'avance.

RODET (30) (1906), cherchant à vérifier les travaux de Moll sur la constitution du flocculat dans la réaction de précipitation, a établi les faits suivants : « Pour de grandes quantités d'antisérum (20-200) ajoutées à une même quantité de sérum, le précipité croît avec la quantité d'antisérum. Pour des quantités de sérum (5-1) ajoutées à une même quantité d'antisérum (10), le précipité augmente quand la quantité de sérum décroît », et plus loin : « En abaissant encore la dose de sérum ajoutée à la même quantité d'antisérum, on voit que la masse du précipité passe par un maximum puis diminue mais seulement avec une grande lenteur. On a, par exemple, maximum de précipité dans une expérience pour antisérum 10+sérum 0,5, le poids du précipité pour antisérum 10+sérum 0,01 n'est qu'environ 2,7 fois plus petit ».

BALTHAZARD (1 bis) (1906), dans son Précis de médecine légale, tient compte également des proportions respectives de sérum et d'antisérum et recommande d' « ajouter à une grande quantité d'antisérum, 5 cm<sup>3</sup> par exemple, quelques gouttes de sérum dont on veut déterminer la nature ».

FLEISCHMANN et MICHAELIS (12) (1907) énoncent un certain nombre de lois qui régissent la formation des précipités par action d'une précipitine sur un précipitogène. Ces lois ont une importance considérable. Nous les rapportons plus loin. Leur exactitude semble bien établie.

D. A. WELSH et H. G. CHAPMAN (36) (1907) déclarent eux aussi comme suite à leurs expériences que, dans

la réaction de précipitation, la source principale de la substance précipitable est non pas dans le protoïde « précipité » mais dans le sérum « précipitant » l'optimum de précipitation est obtenu pour un certain rapport des poids de protoïde et d'antisérum (1 de sérum sec+200 d'antisérum sec de lapin). Si on laisse constante la quantité d'antisérum, on diminue le précipité si on augmente la quantité de sérum. — Ces résultats ne nous étaient pas tout à fait inconnus.

Les remarques d'Oscar DEMEES (8) (1907) sur les réactions entre antiglobulines et globulines, antisérums et sérums nous conduisent aux mêmes conclusions.

Un an après (1908), WELSH et CHAPMAN (36 bis) complètent leurs premières observations en introduisant plus de rigueur encore dans leurs résultats. Ils trouvaient que 2 mmgr. 5 d'albumine d'œuf peuvent, par addition de 19 cm<sup>3</sup> d'antisérum, donner 18 mmgr. de précipité (bien lavé et séché), et 1 mmgr. seulement de la même albumine additionné trois fois d'une quantité totale de 52 cm<sup>3</sup> du même antisérum peut fournir en tout 25 mmgr. 9 de précipité, soit 26 fois son propre poids.

JOUSSET (17), en 1910, note lui aussi dans un travail sur le sérum antituberculeux et le précipito-diagnostique de la tuberculose les variations que doivent subir les doses en présence pour changer la quantité du précipité obtenu. « Si à partir d'un certain moment la proportion de sérum croît, le volume du précipité diminue comme s'il y avait redissolution secondaire. »

Plus récemment, M. NICOLLE, CESARI et DEBAINS (24)

(1920) publient une étude sur la précipitation mutuelle des anticorps et des antigènes. « Pour titrer un anticorps il faut en faire agir des doses décroissantes sur une quantité fixe d'antigène; pour titrer un antigène, on se comporte inversement. Rien de plus évident. Mais dans les réactions de précipitines, tout se passe, disent les auteurs, comme si l'antigène précipitait l'anticorps; aussi, pour titrer l'anticorps font-ils agir sur une quantité fixe de celui-ci des quantités croissantes d'antigène.

L'existence du phénomène de zone semble se manifester au cours des réactions de floculation de la syphilis. VERNES (37) a cherché avec le plus grand soin ces variations de floculation des sérums normaux et syphilitiques en fonction des quantités relatives de réactifs en présence. En présence d'une suspension colloïdale ou organique, la floculation du sérum normal est représentée par une courbe passant par un minimum pour une concentration maxima de la suspension, par un maximum pour une concentration intermédiaire puis décroissant pour revenir à zéro au fur et à mesure qu'on diminue la quantité de suspension introduite dans la réaction. Même aspect de la courbe syphilitique qui apparaît simplement décalée par rapport à la courbe du sérum normal.

Eugène-L. OPIE (26) (1923) rapporte à son tour l'action empêchante d'un excès d'antigène. Pour un volume donné d'antigène, le précipité est abondant au maximum pour des volumes de sérum plusieurs centaines de fois plus grands -- la valeur de chaque antigène déterminant la valeur de la réaction.

R. BRUYNOGHE (3) (1924), étudiant un sérum chauffé à 100° ou 120°, constate qu'il n'est plus précipité par la précipitine spécifique du sérum non chauffé, bien que cette précipitine puisse encore servir à le caractériser, car il conserve la propriété d'empêcher, lorsqu'il est ajouté en excès à du sérum frais, la précipitation de ce dernier.

La même année, R. DOURIS et RICARDONI (9), dans un travail d'ordre général sur le titrage des sérums précipitants, recherchent la limite de la sensibilité de la réaction. Sur une quantité fixe d'antisérum, ils font agir des quantités décroissantes d'antigène et constatent que la précipitation n'est nullement en rapport avec la quantité d'antigène. Un graphique très explicite montre que la quantité de précipité tend vers zéro lorsque l'antigène croît.

MONDANI, DOURIS et BECK (22) (1927), traitant des phénomènes de précipitation au sujet du sérodiagnostic du cancer, notent eux aussi le phénomène paradoxal et l'action empêchante d'un excès de substance albuminoïde. DOURIS énonce la loi suivante : « Lorsqu'au cours d'une réaction biologique nous avons production d'un précipité dans la composition duquel entrent des matières albuminoïdes, le précipité formé ou le floculat disparaît sous l'action d'un des constituants qui lui ont donné naissance. »

Ajoutons encore que MM. LE BOURDELLÈS et LIÉGEOIS (18) ont signalé le phénomène de zone dans une note récente consacrée à la sérofloculation du paludisme.

Enfin, WELLS (35), dans son ouvrage « Les aspects

chimiques de l'immunité », traite lui aussi de cette question éminemment complexe de la précipitation. C'est par cet auteur qu'il était nécessaire de terminer l'énumération évidemment succincte de tous ceux qui ont étudié ou simplement relaté le phénomène de zone. WELLS l'aborde de front et son étude, quoique incomplète, pose nettement le problème. Avec lui, il nous est permis de conclure : on entend par phénomène de zone, ou précipitation paradoxale, une réaction qui, mettant en présence une substance précipitante (précipitine) d'une autre à précipiter (précipitogène), aboutit à la production d'un précipité dont les caractères varient avec les doses des substances employées. Dans tous les cas où le précipitogène est en excès, il gêne et s'oppose à la formation du précipité. La précipitine, au contraire, favorise sa production et semble même prendre une part extraordinairement active quant à la quantité de précipité obtenue.

Avec ces deux éléments variables il est aisé de réaliser un système de combinaisons qui illustreront ces données élémentaires :

a) Dans une série de tubes à essais renfermant une quantité constante d'antisérum, on ajoute des quantités progressivement croissantes de sérum : le précipité faible au début disparaît peu à peu, puis tend vers zéro.

b) Dans une deuxième série de tubes, on place des quantités constantes de sérum. On fait croître les quantités d'antisérum, ajoutées régulièrement. Le précipité obtenu est de plus en plus abondant. Il suit une progression croissante, rigoureusement uniforme et

la courbe représentative de sa masse est une droite comme dans un titrage.

Enfin, si dans une troisième expérience, à des doses progressivement croissantes d'antisérum, on ajoute des quantités progressivement décroissantes de sérum de telle sorte qu'aux extrêmes une dose maxima de sérum soit portée au contact d'une dose minima d'antisérum, tandis qu'inversement une quantité maxima d'antisérum agit sur une autre minima de sérum, le précipité obtenu, nul à l'origine, naît, puis croît peu à peu jusqu'à atteindre un volume maximum pour les derniers tubes de l'expérience.

FLEISCHMANN et MICHAELIS ont énoncé sur ce phénomène les trois lois suivantes :

1° Pour une quantité donnée de précipitogène la masse de précipité est proportionnelle à la quantité de précipitine.

2° Si on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressives de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène. Ce phénomène est connu sous le nom de « phénomène de zone ».

3° Pour des quantités constantes des deux réactifs, la quantité de précipité obtenue est inversement proportionnelle au volume de liquide utilisé dans la réaction.

---



### CHAPITRE III

---

## Mécanisme du Phénomène de Zone dans la Précipitation

---

Quelques auteurs s'attachèrent à donner au phénomène de zone une explication rationnelle. Et en premier lieu, il importe d'examiner l'opinion de BORDET. Nous pouvons résumer à peu près ainsi l'hypothèse de cet auteur : Le phénomène de zone s'expliquerait par la réduction de l'activité de l'agglutinine consécutive à la dissémination de cet anticorps sur une masse trop considérable d'antigène. Et cette action ne caractériserait pas seulement l'anticorps mais aussi l'antigène : suivant que l'une ou l'autre de ces deux substances se trouve en excès dans un milieu, l'action empêchante de cet excès se fait sentir sur la marche générale de la réaction. BORDET (2) s'exprime ainsi : « Lorsqu'on fait tout d'abord apparaître un précipité en mélangeant l'immunsérum à une dose

relativement faible d'antigène et qu'on ajoute ensuite un excès de celui-ci, on constate très souvent au moins à la température ordinaire, que le précipité formé persiste. Mais il arrive aussi qu'il disparaît. Cette solubilisation s'effectue — notamment quand il s'agit de mélanges de sérums antigènes aux immunsérums correspondants — beaucoup plus aisément à la température de l'étuve (BORDET-GENGOU). Sans doute ne s'agit-il pas, à vrai dire, en pareille circonstance, d'une simple redissolution du complexe qui s'était précipité: il est plus admissible que la composition de celui-ci se modifie; très probablement il perd une partie de l'anticorps entrant dans sa constitution, laquelle passe sur la nouvelle dose d'antigène ajoutée au mélange; en somme, l'anticorps manifeste alors une tendance plus ou moins prononcée, selon les cas, à se répartir également sur la totalité de l'antigène présent — et le phénomène est en tous points comparable à celui qui s'effectue lorsqu'on ajoute à des globules rouges fortement sensibilisés de nouveaux globules de même espèce; comme nous l'avons rappelé plus haut, la sensibilisatrice qui s'était fixée se transmet en partie aux éléments introduits en dernier lieu. Il faut conclure que l'aptitude du complexe à se précipiter varie selon les doses relatives des deux constituants. Souvent c'est l'excès d'antigène qui entrave la précipitation, mais c'est parfois aussi celui de précipitine. »

Une théorie qui nous paraît devoir être soutenue à propos du phénomène de zone est celle du colloïde protecteur. On sait que si l'on mélange ensemble deux

colloïdes on peut observer une diminution de la stabilité des colloïdes en présence, qui se traduit par une floculation — ceci surtout lorsque les deux colloïdes sont de signe inverse. Mais l'effet contraire peut être observé, l'addition d'un colloïde à un autre le protège contre la coagulation. Cette action protectrice se manifeste notamment, d'après J. DUCLAUX (10), quand le premier colloïde est stable et le second instable au contraire. L'explication de ce phénomène du colloïde protecteur est d'ailleurs mal connue. Diverses interprétations ont été proposées : adsorption par le colloïde instable du colloïde stable protecteur qui lui impose ses propriétés et son signe électrique, — rôle mécanique du colloïde qui empêche la réunion des micelles du colloïde instable pour former des flocons de coagulum de grosseur visible.

Il est possible que dans le phénomène de zone, les protéines étrangères à la réaction, ajoutées en excès, avec l'excès d'antigène interviennent comme colloïdes protecteurs.

Pour HOLKER (15), la chimie-physique permettrait de comprendre de la façon suivante la réaction de zone manifestée par le sérum précipitant et l'antigène.

D'après les expériences de DEAN, l'addition d'une minime quantité d'antigène au sérum provoque la précipitation des particules d'euglobuline plus volumineuses et la quantité de précipité produite est faible. Pour une proportion plus considérable d'antigène, les particules plus petites sont précipitées et la masse du précipité augmente. Pour des quantités d'antigène encore plus élevées, le potentiel électrique à la sur-

face de la totalité de l'euglobuline est annulé et le précipité atteint pour cette raison une quantité maxima.

Au delà de ce point, l'addition d'antigène a pour effet de porter le potentiel électrique de certaines particules du sérum au delà de zéro et de changer le signe de leur charge assurant ainsi leur stabilité. Dès lors, le précipité régresse et pour une dose d'antigène suffisante toutes les particules d'euglobuline sont stabilisées.

Les interprétations données du phénomène de zone sont donc nombreuses. Elles demeurent surtout des interprétations, les faits expérimentaux recueillis à ce sujet sont encore peu nombreux — les plus intéressants pouvant bien être les expériences de DEAN, ci-dessus rapportées, relatées par HOLKER, puis par WELLS. Le déterminisme du phénomène apparaît évidemment complexe, ainsi qu'il est de règle en matière de réactions intercolloïdales. Nous avons cherché, à notre tour, d'élucider ce mécanisme. Nous nous sommes proposé d'étudier les variations des propriétés physiques du mélange précipitogène-précipitine en fonction du phénomène de zone.

C'est ainsi que nous avons examiné successivement : viscosité, tension superficielle, PH.

### Expériences personnelles

Les expériences pratiquées — et que nous allons relater ci-après — sont incomplètes en raison des

multiples difficultés expérimentales du sujet et des quantités notables de sérum précipitant nécessaire pour les recherches. Il ne nous a pas été aisé de nous le procurer toujours en temps utile. Nous nous sommes proposé tout d'abord de vérifier l'existence du phénomène de zone et des lois classiques de FLEISCHMANN et MICHAELIS. Le dispositif expérimental était le suivant :

Dans une série de tubes à essais, on place des quantités croissantes de sérum précipitant (sérum de lapin anti-humain), 3, 6, 9 gouttes... jusqu'à atteindre le nombre limite de 30 gouttes qui représente la dose maxima et constante pour un certain nombre de tubes. On ajoute ensuite des doses de sérum précipitable (sérum humain) de façon à répéter, mais en sens inverse, l'opération qui pient d'être effectuée. Il convient d'agiter soigneusement chaque tube après chaque mélange pour mêler aussi intimement que possible précipitine et précipitogène. Le tout est porté à l'étuve à 37° et lecture est faite après une heure.

On a ainsi le tableau suivant :

| Précipitine | Précipitogène | Précipité |
|-------------|---------------|-----------|
| 3           | 30            | —         |
| 6           | 30            | —         |
| 9           | 30            | —         |
| 12          | 30            | ±±        |
| 15          | 30            | ±±        |
| 18          | 30            | +         |
| 21          | 30            | +         |
| 24          | 30            | ++        |
| 27          | 30            | ++        |
| 30          | 30            | ++        |
| 30          | 27            | ++        |
| 30          | 24            | ++        |
| 30          | 21            | +++       |

| Précipitine | Précipitogène | Précipité |
|-------------|---------------|-----------|
| 30          | 18            | + + +     |
| 30          | 16            | + + +     |
| 30          | 12            | + + +     |
| 30          | 9             | + +       |
| 30          | 6             | + +       |
| 30          | 3             | + +       |

L'examen de ce tableau permet la vérification des deux premières lois de MICHAELIS et FLEISCHMANN. En effet :

I. — Pour une quantité donnée de précipitogène (30 gouttes), la masse de précipité obtenue est proportionnelle à la quantité de précipitine (3, 6, 9... 30 gouttes).

II. — Si on ajoute à une quantité donnée de précipitine (30 gouttes) des quantités progressives de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement, puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène.

Pour la troisième loi de ces mêmes auteurs, nous avons réalisé le dispositif suivant : des quantités constantes de précipitine et de précipitogène étaient placées dans des tubes à essais, dans les conditions optimales pour obtenir un précipité abondant — soit 20 gouttes de précipitine pour 10 de précipitogène. Dans chaque tube était ajouté ensuite du sérum physiologique par doses régulièrement croissantes pour réaliser une dilution progressive 5, 10, 15... 45, 50 gouttes. On obtient ainsi le tableau suivant :

| Précipitine | Précipitogène | Sérum Phys. | Précipité |
|-------------|---------------|-------------|-----------|
| 20          | 10            | 5           | +++       |
| 20          | 10            | 10          | +++       |
| 20          | 10            | 15          | +++       |
| 20          | 10            | 20          | ++        |
| 20          | 10            | 25          | ++        |
| 20          | 10            | 30          | ++        |
| 20          | 10            | 35          | ++        |
| 20          | 10            | 40          | +         |
| 20          | 10            | 45          | +         |
| 20          | 10            | 50          | +         |

Mais il y a plus. La production du phénomène de zone mettant en jeu des sérums et des antisérums, il était naturel de rechercher ce que devenaient, au cours de la production du phénomène, les caractéristiques de ces éléments : viscosité, tension superficielle, PH.

*Viscosité.* — La viscosité joue un rôle certain dans le maintien de la stabilité colloïdale, ainsi que l'ont démontré les expériences de ZSIGMONDY. On sait, par exemple, que la glycérine peut, de part sa viscosité, se comporter comme un stabilisant des extraits d'organes, des venins, des ferments. Il était donc indiqué de rechercher si les variations de la viscosité provoquées par le mélange en proportions variables du précipitogène et du sérum précipitant ne puissent être rendues responsables du phénomène de zone. Nous avons procédé de la façon suivante : Nous avons employé comme appareil le viscosimètre classique de Walter Hess. Les viscosités du sérum précipitant et du précipitogène étaient prises séparément, puis les mélanges réalisés dans les proportions habituelles. Après étuve à 37° et apparition du phénomène de zone, la viscosité était prise dans tous les tubes de la

réaction. Les résultats sont consignés dans le tableau suivant :

| Sérum<br>Précipitant | Précipitogène | Sans Glycérine<br>V $\left( \frac{\text{Précipiline} = 1,1}{\text{Précipitogène} = 1,1} \right)$ |     | Glycérine 10 %<br>V $\left( \frac{\text{Précipiline} = 1,2}{\text{Précipitogène} = 1,3} \right)$ |     | Glycérine 25 %<br>V $\left( \frac{\text{Précipiline} = 2,1}{\text{Précipitogène} = 2,2} \right)$ |     |
|----------------------|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4                    | 20            | —                                                                                                | 1,1 | —                                                                                                | 1,5 | —                                                                                                | 2,1 |
| 6                    | 20            | $\pm$                                                                                            | 1,1 | —                                                                                                | 1,5 | —                                                                                                | 2,1 |
| 8                    | 20            | $\pm$                                                                                            | 1,1 | —                                                                                                | 1,5 | —                                                                                                | 2,1 |
| 10                   | 20            | $\pm$                                                                                            | 1,1 | —                                                                                                | 1,5 | —                                                                                                | 2,2 |
| 12                   | 20            | $\pm$                                                                                            | 1,1 | $\pm$                                                                                            | 1,5 | —                                                                                                | 2,2 |
| 14                   | 20            | +                                                                                                | 1,1 | $\pm$                                                                                            | 1,5 | —                                                                                                | 2,2 |
| 16                   | 20            | ++                                                                                               | 1,1 | $\pm$                                                                                            | 1,5 | —                                                                                                | 2,1 |
| 18                   | 20            | ++                                                                                               | 1,1 | $\pm$                                                                                            | 1,5 | —                                                                                                | 2,1 |
| 20                   | 20            | ++                                                                                               | 1,1 | +                                                                                                | 1,4 | —                                                                                                | 2,2 |
| 20                   | 18            | ++                                                                                               | 1,1 | +                                                                                                | 1,4 | —                                                                                                | 2,1 |
| 20                   | 16            | +++                                                                                              | 1,1 | +                                                                                                | 1,4 | —                                                                                                | 2,1 |
| 20                   | 14            | +++                                                                                              | 1,1 | +                                                                                                | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2   |
| 20                   | 12            | +++                                                                                              | 1,1 | +                                                                                                | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2   |
| 20                   | 10            | +++                                                                                              | 1,1 | ++                                                                                               | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2,1 |
| 20                   | 8             | +++                                                                                              | 1,1 | ++                                                                                               | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2,1 |
| 20                   | 6             | ++++                                                                                             | 1,1 | ++                                                                                               | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2,2 |
| 20                   | 4             | ++++                                                                                             | 1,1 | +++                                                                                              | 1,4 | $\pm$                                                                                            | 2,2 |

De cette expérience, on peut conclure que le facteur viscosité est extérieur au phénomène de zone et n'intervient pas dans le mécanisme. Mais si l'on fait varier en plus ou en moins la viscosité d'une quantité égale dans tous les tubes de la réaction, le facteur viscosité intervient pour accentuer ou pour inhiber les effets du phénomène de zone. C'est ce qui résulte de l'expérience réalisée dans les colonnes 2 et 3 du tableau ci-dessus. Il est donc possible que le phénomène de zone soit déplacé dans les conditions naturelles, par suite de l'hyperviscosité de certains sérums ou de leur hypoviscosité.

# PH ET TENSION SUPERFICIELLE.

Nous avons étudié ces deux facteurs dans une unique expérience que nous relatons ci-dessous.

Le PH a été mesuré par la méthode colorimétrique à l'aide de l'échelle de Clarke.

La tension superficielle a été déterminée par la méthode Stalagmométrique à l'aide d'un compte-gouttes calibré. Les résultats ont été les suivants :

| Précipitant | Précipitogène | Eau Physiol. | T. S. | P. H.   |
|-------------|---------------|--------------|-------|---------|
| 3           | 30            | 27 —         | 20,5  | 7,4     |
| 6           | 30            | 24 —         | 21,5  | 7,4     |
| 9           | 30            | 21 —         | 21,5  | 7,4     |
| 12          | 30            | 15 $\pm$     | 21,5  | 7,4     |
| 15          | 30            | 18 $\pm$     | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 18          | 30            | 12 +         | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 21          | 30            | 9 +          | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 24          | 30            | 6 + +        | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 27          | 30            | 3 + +        | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 30            | 0 + +        | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 27            | 3 + +        | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 24            | 6 + +        | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 21            | 9 + + +      | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 18            | 12 + + +     | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 15            | 15 + + +     | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 12            | 18 + + +     | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 9             | 21 + +       | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 6             | 24 + +       | 21,5  | 7,4—7,6 |
| 30          | 3             | 27 + +       | 21,5  | 7,4—7,6 |

Les indications données par ce tableau ne sont pas en faveur de l'influence des variations de la concentration ionique ou de la tension superficielle dans l'apparition du phénomène de zone. PH et tension superficielle paraissent être sensiblement les mêmes aussi bien dans les mélanges stabilisés que dans les mélanges précipités.



## CHAPITRE IV

---

### Le Phénomène de Zone dans les réactions autres que la Précipitation

---

- 1° *Agglutination.*
- 2° *Fixation du complément.*
- 3° *Combinaison toxine-antitoxine.*
- 4° *Réaction entre colloïdes.*

De l'étude du phénomène de zone dans la réaction de précipitation résulte un ensemble de notions précises soumises à un certain nombre de lois bien établies. Est-ce là une caractéristique essentielle des actions précipitantes et qui leur appartient en propre ? Ou, au contraire, poussant plus loin dans le domaine de l'investigation, pouvons-nous aborder au sujet de ce phénomène paradoxal des réactions que leur nature rapproche plus ou moins de la précipitation ? Le

phénomène de l'agglutination, la fixation du complément, la neutralisation d'une toxine par son antitoxine ne présentant pas, *a priori*, de liens communs avec la précipitation, si ce n'est leur caractère de réactions intercolloïdales. Mais cette diversité nous le verrons par la suite — est plus apparente que réelle : nous retrouverons, à l'occasion de chacune de ces réactions, l'homologue du phénomène paradoxal — et c'est là une des raisons qui nous permettent, peut-être, d'entrevoir un lien naturel entre tous ces faits.

Le phénomène de l'agglutination est trop connu pour mériter d'être rappelé longuement : on sait que le sérum d'un animal ayant reçu, à titre d'antigène, une bactérie ou une cellule déterminée, acquiert le pouvoir d'agglutiner, *in vitro*, cet antigène. Il fut observé pour la première fois par BORDET, en étudiant au laboratoire l'action du sérum anticholérique sur le vibron de Koch. Il vit ainsi que les vibrions s'agglutinaient, puis se transformaient en granules.

GRUBER, DURHAM étudient ensuite divers antisérums. Mais c'est assurément WIDAL et SICARD qui ont le mieux fait connaître le phénomène de l'agglutination et son emploi en clinique pour le diagnostic de la fièvre typhoïde. Depuis, ces recherches ont été étendues à tous les germes pathogènes connus et pour la plupart d'entre eux la réaction d'agglutination est couramment employée pour diagnostiquer un état infectieux mal déterminé. Quelle est la nature des agglutinines ?

C'est évidemment là un point très obscur. Mais une opinion doit être retenue parmi toutes les hypothèses

qui furent émises : c'est celles de KRAUS. Pour cet auteur, l'agglutinine n'est pas contenue dans le corps microbien. Et, en effet, un antisérum ajouté à une culture filtrée de microbes correspondants donne un précipité floconneux comme si l'on avait fait agir le sérum sur une culture non filtrée. Nous voyons réapparaître, si l'on admet cette hypothèse, une réaction de floculation à l'origine du phénomène de précipitation et en conséquence nous ne devons pas être surpris de retrouver ici le phénomène de zone qui a été rappelé par plusieurs auteurs.

C'est ainsi que Edmond SERGENT (32), en 1910, dans un mémoire consacré aux acquisitions de l'époque sur le micrococcus mélitensis, s'exprime ainsi : « Le phénomène paradoxal ne manque pas de s'observer avec les agglutinines du mélitensis comme avec celles d'autres bactéries; des réactions sont négatives avec de faibles dilutions (au  $1/10^{\circ}$ ,  $1/20^{\circ}$ ,  $1/30^{\circ}$ , même  $1/100^{\circ}$ ) et positives avec de fortes dilutions (ou  $1/500^{\circ}$ ) ».

F. WIDAL, LEMIERE et ABRAMI (38) (1921), au chapitre « Fièvre typhoïde » du Nouveau Traité de Médecine, recommandent certaines précautions dans l'usage de la réaction du séro-diagnostic typhique. Après avoir indiqué le mode opératoire, les dilutions nécessaires, ils incitent à commencer de préférence la lecture des résultats par les tubes renfermant les solutions les plus diluées. « Il arrive parfois, en effet, que l'agglutination nulle à la dilution de  $1/10^{\circ}$  apparaît, au contraire, dans les dilutions plus étendues  $1/30^{\circ}$  ou  $1/50^{\circ}$ . Ce phénomène paradoxal a été noté par divers auteurs (NEISSER et WECHSBERG, DE BLASI et BERARDONI, CERRITO, JOUFFROY, WEISSENBAACH et GAUTHIER).

En 1923, deux auteurs, A. FOURCADE et LE BOURDELLES (13), dans une étude sur « Deux cas d'infection paratyphique à bacilles d'un type aberrant », s'exprimaient ainsi : « Nous avons étudié l'agglutinabilité de ces germes à l'aide des sérums expérimentaux forts de l'Institut Pasteur de Paris, en utilisant le procédé microscopique et en poussant jusqu'à 1/10.000° la recherche du taux limite. Tous les germes isolés jusqu'au début de 23 se sont montrés facilement agglutinables au sortir de l'organisme, mais ont présenté presque toujours d'une façon remarquable le phénomène paradoxal signalé par divers auteurs, notamment par Edmond SERGENT, pour le groupe *mélitensis*. »

De même, SÉDALLIAN (31), dans sa thèse, rapporte également le phénomène paradoxal dans l'agglutination et dit l'avoir rencontré « très fréquemment dans l'agglutination du streptocoque ». Parmi toutes ces publications, il est nécessaire de retenir le nom d'un auteur qui s'intéressa plus particulièrement à l'apparition du phénomène de zone dans l'agglutination.

M. le Professeur LE BOURDELLES a, dans un travail important, non publié, et adjacent à la note parue en 1923 en collaboration avec A. FOURCADE, étudié l'agglutination de 198 cultures de bacilles divers : Eberth et Para, Shiga, Flexner, *Mélitensis*, *Vibrion cholérique* et même *Proteus* X. 19. Les conditions d'expériences furent celles indiquées dans le texte que nous avons rapporté. Elles permirent à cet auteur de conclure que le phénomène paradoxal dans le séro-diagnostic est très marqué à l'aide de sérums agglutinants

forts. Il l'aurait rencontré à un degré beaucoup moindre avec des sérums dont le taux limite est faible. C'est donc et surtout une caractéristique des sérums forts. Ce phénomène paradoxal est sensiblement moins fréquent dans l'agglutination que dans la précipitation. Enfin, si nous reproduisons un résultat typique de ces nombreuses expériences :

21 - 5 - 23. P. LOPEZ.

|        | 1/50 | 1/100 | 1/200 | 1/400 | 1/1000 | 1/2000 | 1/4000 | 1/10000 |
|--------|------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|
| Eberth | 0    | 0     | 0     | +     | +++    | +++    | +++    | +++     |
| Para A | 0    | 0     | +     | +     | ++     | +++    | +++    | +++     |
| Para B | 0    | +     | +++   | +++   | +++    | +++    | +++    | ++      |

il nous est permis de conclure encore que l'inhibition est plus nette avec le sérum spécifique qu'avec le sérum coagglutinant, et ceci même lorsque le taux limite des agglutinines et des coagglutinines est sensiblement le même.

M. le Professeur Paul COURMONT a fréquemment constaté la réaction paradoxale, non seulement dans l'agglutination du bacille d'Eberth, mais encore dans le séro-diagnostic tuberculeux, dans l'agglutination des cultures homogènes de bacilles de Koch par des sérums d'hommes ou d'animaux tuberculeux. Par exemple, dans une série de tubes où la dilution est portée à 1 p. 5, 1 p. 10, 1 p. 20, 1 p. 30, etc., on peut avoir un résultat positif dans les tubes à 1 p. 20, 1 p. 30 alors qu'il n'y a pas de floculation, ni de précipitation visible dans les premiers tubes. Ces faits sont très importants pour le séro-diagnostic de la tuberculose puisque le taux d'agglutination des sérums tuberculeux est souvent peu élevé, pouvant ne pas dépasser 1 p. 10. Dans ces derniers cas, la cause d'erreur peut

être évitée en diluant simplement le mélange avec une quantité donnée de sérum physiologique sans changer pour cela les rapports entre sérum et culture. Dans le cas où l'agglutination dépasse la zone paradoxale, il suffit de lire les résultats des tubes, là où le sérum est aux plus fortes dilutions.

Il est intéressant en tout cas de noter que le phénomène paradoxal se retrouve avec les cultures homogènes de bacilles tuberculeux comme avec beaucoup d'autres microbes (communication orale).

## Phénomène du Zone et déviation du complément

La mise en évidence des anticorps dans un sérum ou dans toute humeur de l'organisme est réalisée par la réaction dite de « fixation » de BORDET et GENGOU.

Cette réaction est déjà ancienne et tellement classique qu'il est encore ici à peine besoin d'en rappeler les caractères.

L'expérience fondamentale sur laquelle repose la découverte de la fixation est de PFEIFFER. Il injecte une émulsion de vibrions cholériques dans le péritoine d'un cobaye vacciné contre ce germe. L'examen d'un peu d'exsudat péritonéal prélevé par ponction capillaire 10 minutes après l'injection montre que les vibrions ont subi des modifications profondes : leur mobilité a disparu, la plupart sont agglutinés et ont perdu leur forme vibrionienne pour prendre l'aspect de granules fixant plus ou moins la couleur.

METCHNIKOFF a répété *in vitro* l'expérience de PFEIFFER et en tira les conclusions suivantes : une goutte de sérum frais de cobaye vacciné transforme en granules une émulsion de vibrions cholériques.

Le même sérum chauffé au bain-marie à 55° pendant une demi-heure reste sans action sur les vibrions.

Mais si on fait tomber une goutte de lymphé péritonéale normale dans le complexe sérum chauffé et émulsion de vibrions, la transformation en granules se produit. BORDET montra qu'on pouvait obtenir les mêmes résultats en ajoutant une goutte de sérum neuf. Ces deux auteurs arrivèrent ainsi à cette conclusion que le sérum chauffé avait perdu une substance thermolabile, qu'ils appelèrent le complément ou alexine; substance contenue normalement dans la lymphé péritonéale ou le sérum d'un cobaye sain.

Tandis que ce même sérum chauffé conservait une autre substance thermostable spécifique et produite par la vaccination préalable. Ils l'appelèrent : sensibilisatrice.

Le pouvoir bactériologique d'un sérum vacciné est dû à l'union de ces deux substances. Selon la conception de BORDET, la sensibilisatrice agit comme « mordant » et prépare l'action secondaire de l'alexine. Le phénomène de la bactériolyse étant assez exceptionnel et ne s'observant pas avec tous les germes, BORDET et GENGOU imaginèrent l'épreuve de la fixation du complément, avec un système hémolytique pour mettre le phénomène en évidence. C'est sous cette forme que cette réaction put être utilisée pour le diagnostic d'un certain nombre de maladies infectieuses. La

réaction dite de WASSERMANN en est une heureuse application au diagnostic de la syphilis. Mais cette réaction mettant en jeu le complexe antigène-anticorps, nous devons nous attendre à y retrouver le phénomène de zone. Il semble que NEISSER et WECHSBERG, en 1901, aient aperçu pour la première fois sa présence dans la réaction de fixation du complément. On emploie d'ailleurs quelquefois le terme de phénomène de Neisser-Wechsberg comme synonyme de phénomène de zone ou de phénomène paradoxal en matière d'agglutination ou de précipitation. Il porte encore le nom de phénomène de déviation du complément. WELLS fait remarquer avec raison qu'on énonce quelquefois indifféremment « réaction de déviation du complément » au lieu de « réaction de fixation », ou inversement, ce qui n'est pas sans créer une confusion regrettable. NEISSER et WECHSBERG ont constaté que lorsqu'il existe dans un système cytolitique un excès d'ambocepteur en présence d'une quantité limitée d'antigène et de complément la cytolyse ne se produit pas. NEISSER et WECHSBERG ont attribué ce phénomène à l'adsorption du complément par l'excès d'ambocepteur. Cette explication ne peut être admise car le complément ne peut s'unir à un ambocepteur qui n'est pas déjà fixé avec un antigène. THJOTTA (33) a admis la formation d'anticorps inhibiteurs spécifiques.

En réalité, ici encore, il semble bien qu'il s'agisse d'un phénomène de zone et l'on peut admettre avec PANDIT (28) que la « déviation » du complément est liée à une dissociation du complexe antigène-ambocepteur produite par un excès d'ambocepteur.

M. MUIR et W. B. MARTIN (23), en 1907, recherchant les rapports entre la réaction de précipitation et la fixation du complément après plusieurs constatations faites par d'autres auteurs notent que la quantité de sérum nécessaire pour faire dévier l'alexine en présence d'un antisérum peut être extraordinairement faible. Pour une quantité déterminée d'antisérum, il existe un optimum de sérum correspondant qui produit le maximum de fixation.

CALMETTE et MASSOL (4 *bis*) (1909), au cours de travaux sur les conditions de production de la fixation de l'alexine avec les antigènes et les anticorps tuberculeux montrent que la quantité d'alexine fixée est sensiblement proportionnelle aux quantités d'antigène et d'anticorps mis en présence; de sorte qu'avant d'affirmer qu'un sérum ne contient pas d'anticorps, il faut l'avoir essayé en présence de doses variables d'alexine. De plus, l'anticorps en excès sur l'antigène empêche la fixation; enfin l'excès d'antigène, quoique moins nocif que l'excès d'anticorps, doit être évité.

Les mêmes auteurs, en 1910, constatent qu'un certain nombre de sérums d'animaux en cours de vaccination possèdent la propriété d'inhiber la réaction de Bordet-Gengou lorsqu'on en introduit une petite quantité dans le mélange antigène-anticorps. Avant d'ajouter l'alexine, cette propriété inhibitrice ne se produit plus lorsqu'on l'introduit une heure après. L'excès d'anticorps n'influe pas sur l'ensemble de la réaction. L'excès d'antigène provoque la réapparition de la fixation de l'alexine.

CALMETTE et MASSOL (4 *ter*) (1913) démontrent que

certaines sérums antituberculeux possèdent, lorsqu'on les fait agir en excès, la propriété d'inhiber la réaction de fixation de l'alexine.

Et la même année, MASSOL et GRYSEZ (20), procédant à des recherches sur les antigènes et les anticorps typhiques, retrouvent cette réaction inhibitrice : un excès de sérum antityphique empêche la réaction de fixation de l'alexine tandis qu'un excès d'antigène fait disparaître l'inhibition.

La même année, un auteur anglais A. R. DEAN (7) faisait paraître des travaux d'un intérêt particulier : Les recherches de cet auteur portent sur l'appréciation quantitative de la réaction antigène-anticorps-alexine — et sur les rapports qui existent entre la quantité de précipité formée et celle d'alexine absorbée. En présence d'un excès d'antigène ou d'anticorps, l'alexine se fixe moins bien, un léger excès d'antigène qui gêne la fixation est favorable à la précipitation mais en présence d'un trop grand excès cette dernière ne se forme pas non plus.

En 1913 également F.-P. GAY (14) étudie lui aussi les rapports de la réaction de Bordet-Gengou avec des doses variables de sérum et d'antisérum. En fait, on peut, dans certains cas, mettre en évidence ces deux rapports de précipitation pour les mélanges sérums-antisérums. D'autres fois, ces rapports sont assez voisins pour que les « zones de précipitation » se touchent ou empiètent l'une sur l'autre. Les deux précipités formés sont distincts d'aspects et de propriétés. Le premier (formé avec une plus forte proportion d'antigène) se forme lentement, est granuleux, ne se

redissout pas dans un excès d'antisérum. L'autre, plus rapidement formé, est en flocons et se redissout dans l'antigène (sérum de cheval) après enlèvement du second. Ils paraissent donc nettement distincts : le second précipité, non le premier, a des propriétés fixatrices.

JULIA T. PARKER (27) (1923) vérifie les expériences de DEAN sur le dosage précis des proportions d'antigène-anticorps dans les réactions de déviation du complément et emploie la méthode des dilutions progressives. Il constate qu'un excès d'antigène ou d'anticorps peut inhiber la réaction. Il en résulte que de très petites quantités d'antigène arrivent à être décelées par des quantités également très minimes d'anticorps.

La réaction de fixation du complément apparaît plus complexe que les réactions précédentes de précipitation et d'agglutination, puisqu'elle met en jeu un troisième facteur : l'alexine. Mais la fixation du complément est secondaire à la combinaison antigène-anticorps, l'anticorps étant représenté ici par la sensibilisatrice. On ne peut affirmer avec certitude qu'il y ait identité entre les pouvoirs agglutinant et précipitant d'une part et le pouvoir sensibilisant d'autre part. On doit cependant noter que, d'après GAY, le précipité formé par la réaction d'un immunsérum spécifique et d'un antigène soluble contient l'anticorps fixant le complément d'astachie, l'ambocepteur ou sensibilisatrice.

Ce fait, en dehors de toute interprétation à lui donner, doit seul laisser à penser que nous devons retrouver le phénomène de zone dans toutes les réactions de fixation du complément.

### Combinaison toxine-antitoxine

Continuant de revêtir un caractère général et se présentant comme un phénomène satellite habituel de toutes les manifestations de la combinaison antigène-anticorps, le phénomène de zone paraît bien avoir été constaté dans l'étude de la combinaison toxine-antitoxine.

Cette manifestation s'accompagne, en effet, d'un phénomène de précipitation ou de « flocculation » en tout comparable à celui qui marque l'union du précipitogène et de la précipitine. Tel est le point important qui a pu être mis en évidence plus particulièrement dans ces dernières années par M. NICOLLE, CESARI et DEBAINS, puis par RAMON. Antérieurement à ces auteurs, DANYSZ (6) (1902) étudie les propriétés et la nature des mélanges de toxines avec leurs antitoxines et remarque les faits suivants: Si on mélange de la ricine et du sérum antiricinique en proportions différentes, le liquide se trouble toujours immédiatement, et le plus souvent il se forme un précipité. Mais on constate aussi que le temps de formation de ce précipité varie beaucoup dans les différents cas. On trouve même des proportions pour lesquelles les deux substances mélangées ne donnent plus du tout de précipité. En préparant une série suffisamment étendue de ces mélanges dans lesquels les rapports entre les quantités de ricine et d'antiricine varient entre 1/100° et 100/1°, on trouve toujours une proportion pour la-

quelle les deux substances formant le plus rapidement le précipité le plus volumineux — et des deux côtés de cet optimum, deux séries de mélanges dans lesquels les temps de la formation du précipité n'augmentent pas régulièrement mais par zones qui se suivent d'une façon très irrégulière.

Le précipité qui se forme quand on mélange une solution de ricine avec un sérum anti en proportions optima est trop volumineux pour que l'on puisse le considérer comme exclusivement constitué par la ricine et l'antiricine contenues dans un liquide.

Pourtant un sérum qui ne contient pas d'antitoxine ne précipite pas par la ricine et le précipité formé dans un mélange en proportions optima contient toute la ricine et l'antiricine qui se trouvent dans le liquide. Il est donc certain que si le précipité contient d'autres substances en dehors de la ricine et de l'antiricine, sa formation est une fonction exclusive de ces deux solutions. « Ce qu'il suffit de faire ressortir ici avant tout, c'est d'abord le fait que pour donner un précipité, la ricine et l'antiricine doivent s'imprégner ou se fixer en proportions déterminées et qu'il y a un optimum de proportions dans lesquelles les deux substances mélangées ensemble se fixent et donnent le plus rapidement le précipité le plus volumineux ».

CALMETTE et MASSOL (4) (1909), étudiant les précipitines d'un sérum antivenimeux, vis-à-vis du venin de cobra, donnent à leur mémoire les conclusions suivantes :

1° Le sérum de cheval vacciné contre le venin de cobra précipite ce venin,

2° Ce précipité n'apparaît qu'au moment où le mélange sérum et venin devient atoxique et après environ une heure à la température du laboratoire. Il ne se produit plus lorsque le sérum est en excès.

3° Il en résulte que cette réaction précipitante peut servir à mesurer approximativement, *in vitro*, la valeur antitoxique d'un sérum antivenimeux.

4° Dans un mélange sérum et venin exactement neutralisé, le précipité et le liquide séparés par centrifugation sont atoxiques.

Un phénomène de même ordre a été signalé à nouveau par B. A. HOUSSAY et J. NEGRETE (1917), dans un mémoire relatif aux propriétés précipitantes spécifiques des sérums antivenimeux. Ces auteurs notent que si à des quantités égales de sérum contenues dans une série de tubes à essais, on ajoute des doses régulièrement croissantes de venin, la précipitation, après avoir cru progressivement, décroît jusqu'à un minimum puis augmente rapidement de nouveau jusqu'à un maximum stable.

M. NICOLLE, CESARI, DEBAINS (24 *bis*), en 1919, attirent d'une façon toute particulière l'attention sur les précipitations que l'on observe dans les mélanges toxines-antitoxines et, en 1920, proposent d'appliquer ce phénomène non plus seulement au titrage du sérum antivenimeux mais à celui des sérums antidiphthérique et antitétanique. La technique proposée par ces auteurs est la suivante :

On sature par le sulfate de soude anhydre, des filtrats de cultures diphthériques et tétaniques. On sè-

che les précipités obtenus (vide sulfurique) et on les réduit en poudre homogène. On dissout 0 g. 8 de poudre dans 10 cm<sup>3</sup> d'eau distillée : le liquide résultant tue le cobaye de 550-650 gr. au 1/800 de cm<sup>3</sup> sous la peau (poison diphtérique) et au 1/12.000 dans le muscle (poison tétanique) on mêle à parties égales la solution toxique et une solution préalablement fondue (40°) de gélatine dans l'eau physiologique (10 pour 100) de gélatine (réaction neutre). On répartit le mélange en tubes sous le volume de 1 cc. cube. On fait fondre à la glacière. On verse sur les culots solides 1 cm<sup>3</sup> de sérum antitoxique de plus en plus dilué : au 1/20 1/50...1/200.

On abandonne pendant deux heures (température ambiante) et on lit. Tout résultat positif se traduit par un disque blanc bleuâtre au-dessus de la limite du sérum dilué et de la toxine-gélatine. Il importe que solution toxique et sérum soient absolument limpides.

Il appartenait enfin (29) à G. RAMON (1922) de mettre définitivement au point la méthode du titrage des mélanges toxine-antitoxine par le phénomène de flocculation.

La technique de G. RAMON telle qu'il la définit dans un mémoire d'ensemble de 1923 est la suivante :

« Dans un porte-tubes disposons une série de tubes à essais; versons dans chacun 20 cm<sup>3</sup> d'une toxine diphtérique, filtrée au neuvième jour de culture et tuant en quatre jours un cobaye de 250 gr. à la dose de 1/500 de cm<sup>3</sup>; ajoutons dans ces tubes des quantités décroissantes : 1 cm<sup>3</sup> 5, 1 cm<sup>3</sup>, 0 cm<sup>3</sup> 9, 0 cm<sup>3</sup> 8,

0 cm<sup>3</sup> 7, 0 cm<sup>3</sup> 6, 0 cm<sup>3</sup> 5, 0 cm<sup>3</sup> 45... etc., d'un sérum antidiphthérique frais titrant 200 unités d'Ehrlich au centimètre cube.

Agitons pour mélanger toxine et sérum. Nous constatons bientôt que le liquide de plusieurs de ces tubes devient opalescent, cette opalescence augmente graduellement et au bout d'un temps variable (quelques heures à la température ordinaire) elle se transforme peu à peu en flocons de plus en plus nets. Cette floculation est spécifique car elle ne se montre ni avec le sérum normal ni avec le sérum antitétanique, ni avec une autre antitoxine, non plus qu'avec la toxine modifiée par chauffage à 100°. Elle est la manifestation visible la plus caractéristique de la réaction entre la toxine et l'antitoxine diphtérique.

Si on suit avec attention la marche de l'expérience on remarque que la floculation apparaît dans un des tubes, par exemple celui qui contient 0 cm<sup>3</sup> 6 de sérum avant de se déclarer dans les tubes voisins. Cette floculation initiale a une signification particulière au point de vue des proportions de toxine et d'antitoxine présentes dans le mélange. En effet, injectons à des cobayes des doses de un ou plusieurs centimètres cubes du mélange toxine-sérum antidiphthérique dans lequel est apparue la floculation initiale, elles ne provoquent ni lésions locales ni symptômes généraux précoces ou tardifs d'intoxication diphtérique. Ce mélange est en outre incapable de protéger ces animaux contre l'action nocive d'une nouvelle quantité de toxine qu'on leur ajoute. Par contre les mélanges qui ont floculé plus tardivement et qui contiennent des

quantités de sérum soit immédiatement inférieures, soit immédiatement supérieures, sont les premiers de plus en plus toxiques, les seconds de plus en plus antitoxiques. Ainsi dans le mélange qui floccule en premier lieu et qui se montre inoffensif pour les animaux, la toxine et l'antitoxine se sont mutuellement annihilées dans leurs effets, il y a neutralisation ou mieux saturation réciproque aussi parfaite que possible des deux constituants du mélange : l'antigène et l'anticorps. Cette saturation se manifeste par l'intensité maximum de la réaction, laquelle se traduit elle-même par le phénomène physique de floculation plus rapide dans ce mélange que dans les autres mélanges, dans lesquels la saturation est incomplète et la floculation retardée. »

Tous ces faits sont-ils des phénomènes de zone ? Les analogies avec le phénomène paradoxal semblent bien évidentes, le phénomène en jeu est un phénomène de précipitation : le maximum de précipitation est réalisé lorsqu'il existe ni excès d'antigène ni excès d'anticorps. L'excès de l'une ou de l'autre des deux substances en jeu pèse sur la réaction. Comme dans le phénomène de zone le maximum n'est pas observé pour les quantités maxima en présence d'antigène ou d'anticorps.

En résumé l'analogie paraît évidente. La réaction de floculation de Ramon nous paraît devoir être interprétée comme un phénomène de zone observé dans le temps.

## Phénomène de Zone dans les réactions intercolloïdales

Nous avons examiné jusqu'à présent le phénomène de zone dans les réactions spécifiques de précipitation et dans les diverses manifestations de la combinaison antigène-anticorps. Mais le phénomène de zone n'est nullement lié à la spécificité ainsi que nous avons déjà eu l'occasion de le dire; il est lié simplement à l'interréaction colloïdale prise en elle-même. Il semble donc qu'il puisse apparaître dans les réactions banales de floculation intercolloïdale qui se produisent fréquemment lorsque deux colloïdes de signes opposés sont mis en présence. L'expérience démontre la véracité de cette hypothèse. Il est aujourd'hui classique en colloïdologie de dire que la précipitation de deux colloïdes de signes opposés dépend (entre autres facteurs) des proportions en présence (1).

Nous nous contenterons de relater à ce sujet quelques faits empruntés aux traités classiques. J. DUCLAUX (10) écrit les remarques très précises suivantes: « Connaissant la nature et la composition des micelles on pourra en général prévoir ce qui se passera et écrire la formule de la réaction.

C'est ainsi qu'on peut rendre compte d'un fait assez remarquable, celui des zones de précipitation. En général, lorsque deux colloïdes se précipitent l'un l'au-

(1) J. Duclaux. Les Colloïdes (10).

tre la précipitation n'est complète que pour certaines proportions des deux colloïdes.

Elle est incomplète si l'on s'éloigne de ces proportions et ne se produit plus si on s'en écarte trop. C'est ce que montre le tableau suivant, relatif aux mélanges, en proportions variables de deux matières, colorantes colloïdales de signes opposés, l'azobléu et le rouge neutre. On mélange volumes égaux des deux solutions dont l'une l'azobléu a une concentration constante de 0,02 pour 100 et l'autre une concentration variable de 0,02 à 0,00125 pour 100. Le signe + indique qu'un précipité se forme et le signe — qu'il ne se forme pas. La troisième colonne donne l'aspect du mélange après qu'il a déposé pendant 24 heures.

| Rouge neutre | Précipité | Tyret           |
|--------------|-----------|-----------------|
| 0,02         | +         | rouge           |
| 0,0125       | +         | rouge           |
| 0,0100       | +         | rouge pâle      |
| 0,0085       | +         | <i>incolore</i> |
| 0,0066       | +         | violet pâle     |
| 0,0055       | —         | violet          |
| 0,0025       | —         | violet          |
| 0,00125      | —         | bleu            |

Dans ces cas, la concentration qui donne la précipitation totale est définie à 10 p. 100 près environ. Cette précipitation est bien due à une réaction chimique quantitative, car lorsque les concentrations échangent, les proportions relatives des deux colloïdes qui donnent la précipitation complète, ne changent pas.

|               |                   |                     |
|---------------|-------------------|---------------------|
| Azobléu 1/50° | est précipité par | rouge neutre 1/120° |
| » 1/120°      | »                 | » 1/300°            |
| » 1/200°      | »                 | » 1/400°            |
| » 1/400°      | »                 | » 1/800°            |

De même, on trouve dans l'ouvrage de WELLS (35) :  
 « Les tableaux suivants illustrent remarquablement cette conception (analogies entre réaction colloïdales et agglutination). Le premier montre qu'une émulsion de gomme mastic est facilement précipitée par de très petites quantités de ClNa après sensibilisation par de faibles proportions de gélatine, de la même manière que les bactéries sensibilisées par les agglutines sont floculées par la minime quantité de sel présente dans la suspension. Le second tableau indique l'analogie du phénomène de zone des réactions purement colloïdales avec l'action inhibitrice observée dans les réactions d'agglutination et de précipitation, par addition d'un excès d'antigène capable de produire les réactions en concentrations plus faibles.

TABLEAU I

| Cl Na sol. à 10 % | 1 cm <sup>3</sup> de mastic<br>(1 p. 19 de la sol. initiale)<br>dans un vol. total de 3 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> de mastic + 0,0001 cm <sup>3</sup><br>d'une sol. de gélatine à 20 %<br>sous un vol. total de 3 cm <sup>3</sup> |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 C <sup>3</sup>  | + + +                                                                                                   | + + +                                                                                                                            |
| 0,5               | 0                                                                                                       | + + +                                                                                                                            |
| 0,25              | 0                                                                                                       | + + +                                                                                                                            |
| 0,125             | 0                                                                                                       | + + +                                                                                                                            |
| 0,05              | 0                                                                                                       | 0                                                                                                                                |
| 0,025             | 0                                                                                                       | 0                                                                                                                                |

TABLEAU II

| Hydrate de fer<br>colloïdal | Précipitation de l'émulsion<br>de mastic 1 cm <sup>3</sup> |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------|
| 1,0                         | 0                                                          |
| 0,5                         | 0                                                          |
| 0,25                        | 0                                                          |
| 0,1                         | + +                                                        |
| 0,05                        | + + +                                                      |
| 0,025                       | + + +                                                      |
| 0,01                        | + + +                                                      |
| 0,005                       | + + +                                                      |
| 0,0025                      | + +                                                        |
| 0,001                       | 0                                                          |

## Application à la Médecine légale

Une application immédiate de l'étude du phénomène de zone peut être faite à la médecine légale et en particulier à la réaction d'Uhlenhuth. On sait que la reconnaissance des taches de sang constitue l'une des recherches les plus importantes de la médecine légale. Mais si la formation de cristaux d'hémine, l'examen spectroscopique permettent avec une aisance relative de déterminer l'origine sanguine d'une tache suspecte, seule la réaction précipitante affirme avec certitude que la substance analysée est du sang d'origine humaine. « Il n'est pas exagéré de dire que cette découverte est la plus importante dont ait bénéficié la médecine légale dans ces vingt dernières années. Dès à présent elle doit être utilisée par le médecin expert dans tous les cas où il sera commis pour l'examen d'une tache de sang. » (BALTHAZARD, *loc. cit.*).

Il en résulte que ces épreuves se complètent nécessairement; elles sont inséparables.

Les premières démontrent qu'il s'agit d'hémoglobine, la deuxième que cette hémoglobine a pour substratum des protéines humaines. Il importe donc pour plus de rigueur de rechercher avec soin les causes qui peuvent agir sur la réaction précipitante soit pour la faire apparaître dans de meilleures conditions, soit pour l'annihiler. C'est ainsi que la chaleur exerce une

influence sur la rapidité de la réaction. Mais au bout de vingt-quatre heures, l'abondance du précipité, est la même quelle que soit la température à laquelle on maintient le sérum, à condition de rester entre 0 et 58°. La réaction du milieu a une certaine importance : l'addition de l'acide sulfurique à 1 p. 100 n'empêche pas la réaction, mais le précipité est moins abondant. L'addition d'alcalis gêne moins : mais c'est en milieu neutre qu'il convient d'opérer pour observer le précipité avec le plus de netteté. Les solutions concentrées de potasse, de soude, d'alun... précipitent l'antisérum et le précipité est parfois difficile à distinguer des précipités formés par le sérum correspondant. Jusqu'à la concentration de 5/100 la présence du chlorure de sodium est sans influence sur l'abondance du précipité; avec une concentration plus élevée le précipité devient moins abondant. Il n'y a donc aucun inconvénient à dissoudre les taches de sang dans la solution salée physiologique à 9 p. 1000.

Mais il est un facteur plus important encore par son influence immédiate sur la quantité de précipité obtenue : c'est la proportion relative des quantités de sérums mis en présence. BALTHAZARD avait déjà signalé ce fait : mais le mérite de l'avoir récemment, et d'une manière très complète, mis en évidence, revient à M. le Professeur ETIENNE-MARTIN et M. le Professeur agrégé ROCHAIX.

Dans une communication aux *Annales de Médecine légale*, MM. ETIENNE-MARTIN et ROCHAIX s'expriment ainsi : « Les bactériologistes connaissent bien le « phé-

nomène paradoxal » que l'on observe de temps à autre au cours des réactions d'agglutination.

« Alors que les dilutions les plus fortes donnent les résultats positifs dans les délais ordinaires, les dilutions plus concentrées restent homogènes et ne laissent constater aucune trace d'agglutination, ou seulement une ébauche insignifiante. Nous avons eu l'occasion d'observer un phénomène tout à fait comparable au cours de la réaction de précipitation pratiquée en vue de l'identification d'une tache de sang. Il ne semble pas que le « phénomène paradoxal » ait été signalé dans la réaction d'Uhlenhuth et il paraît utile d'attirer l'attention sur lui pour éviter des erreurs ou faire disparaître la perplexité de l'esprit des médecins légistes appelés à la pratiquer. »

MM. ETIENNE-MARTIN et ROCHAIX opéraient avec un sérum de lapin antihumain et une macération dans l'eau physiologique de croutelles de sang. Leur dispositif était le suivant :

- 1 goutte de sérum précipitant ajoutée à 10 gouttes de macération;
- 1 goutte de sérum précipitant ajoutée à 10 gouttes d'une solution à 1 p. 10 dans l'eau physiologique;
- 1 goutte de sérum précipitant ajoutée à 10 gouttes d'une dilution à 1 p. 100 dans l'eau physiologique;
- 1 goutte de sérum précipitant ajoutée à 10 gouttes d'une dilution à 1 p. 1000 dans l'eau physiologique.

Au bout de quelques heures à la température du laboratoire on constatait un trouble et un précipité net seulement dans les deux derniers tubes renfermant des dilutions à 1 p. 100 et 1 p. 1000 et rien dans les premiers tubes.

Devant ce résultat les auteurs montèrent une deuxième expérience sur le schéma suivant :

| Sérum précipitant |      |            | Liquide de macération |           |
|-------------------|------|------------|-----------------------|-----------|
| 10 gouttes        | pour | 10 gouttes |                       |           |
| 5 »               | »    | 10 »       |                       |           |
| 4 »               | »    | 10 »       |                       |           |
| 3 »               | »    | 10 »       |                       |           |
| 2 »               | »    | 10 »       |                       |           |
| 1 »               | »    | 10 »       |                       |           |
| 1 »               | »    | 10 »       | d'une solution à      | 1 p. 5    |
| 1 »               | »    | 10 »       | »                     | 1 p. 10   |
| 1 »               | »    | 10 »       | »                     | 1 p. 50   |
| 1 »               | »    | 10 »       | »                     | 1 p. 100  |
| 1 »               | »    | 10 »       | »                     | 1 p. 500  |
| 1 »               | »    | 10 »       | »                     | 1 p. 1000 |

Les premiers tubes qui se troublèrent furent ceux renfermant des dilutions de macération à 1 p. 10, 1 p. 50, 1 p. 100, au bout de 5 à 6 heures. Puis au bout de 8 à 9 heures, la dilution à 1 p. 5. Au bout du même laps de temps les dilutions à 1 p. 500 et 1 p. 1000 présentèrent une amorce de réaction (léger trouble). Le lendemain matin (24 heures) tous les tubes présentaient une réaction très positive avec forte précipitation dans les tubes à dilution faible.

On voit quelle cause d'erreur peut représenter le phénomène de zone dans la pratique de la réaction d'Uhlenhuth.

Ces faits doivent inciter l'expérimentateur à rechercher la précipitation spécifique avec une gamme de dilution du liquide de macération en partant de dilutions élevées.

## Conclusions

---

I. — Le « phénomène paradoxal » ou « phénomène de zone » a été fréquemment observé au cours des réactions de précipitation et d'agglutination. Mais il est toujours resté à l'état de constatation isolée.

II. — Dans la réaction de précipitation on l'observe dans tous les cas où il y a un excès de substance précipitable.

III. — Comme l'ont montré FLEISCHMANN et MICHÆLIS « si on ajoute à une quantité donnée de précipitine des quantités progressivement croissantes de précipitogène, la masse de précipité obtenue croît d'abord proportionnellement, puis décroît et tend vers zéro pour un certain excès de précipitogène. »

IV. — Nos expériences ont confirmé le résultat obtenu par les auteurs allemands.

V. — Nous avons montré que la viscosité intervient pour rendre le phénomène plus précoce et plus intense.

VI. — La tension superficielle et le P.H. n'intervient pas dans la production du phénomène.

VII. — Pour des quantités constantes des deux réactifs la quantité de précipité obtenue est inversement proportionnelle au volume de liquide utilisé dans la réaction (3<sup>e</sup> loi de FLUSCHMANN et MICHAÉLIS).

VIII. — Le phénomène de zone doit être envisagé pour des réactions autres que la précipitation. Agglutination, fixation du complément, réaction toxine-antitoxine, réactions intercolloïdales en général. Les conditions d'apparition sont différentes, comme par exemple l'excès d'agglutines pour le phénomène de zone obtenu dans l'agglutination.

IX. — La médecine légale présente une application importante de l'étude du phénomène de zone : pour déterminer l'origine humaine d'une tache de sang par la réaction d'Uhlenhuth, il importe d'opérer avec les doses de dilution que nous avons indiquées, pour éviter de graves erreurs.

|              |                           |
|--------------|---------------------------|
| Vu :         | LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE, |
| LE DOYEN,    | E. MARTIN.                |
| JEAN LEPINE. |                           |

*Vu et permis d'imprimer*

Lyon, le 21 Novembre 1928

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,  
GHEUSI,

## Bibliographie

---

1. BALTHAZARD. — *Thèse de Paris*, 1903. Toxine et Antitoxine Typhiques.  
— *Médecine Légale*. Ballière et Fils, Paris, 1905.
2. BORDET. — *Traité de l'immunité*. Masson et Cie, Paris, 1920.
3. R. BRUYNOGHE. — L'identification du sérum chauffé. Le précipitogène du sérum chauffé. *Soc. Belge Biol.*, 28 juin 1924; in *Comptes R. Soc. Biol.*, t. XCI, pp. 384-386.
4. CALMETTE et MASSOL. — Les Précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de cobra. *Annales I. Pasteur*, 1909, t. XXIII, p. 155-165.  
— Sur les conditions d'obtention de la réaction de déviation de l'alexine (Bordet-Gengou) avec les antigènes et les anticorps tuberculeux. *R. C. Soc. Biol.*, 1910, t. LXVI, p. 528.  
— Sur une nouvelle réaction masquant dans les sérums la présence des anticorps tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1910, t. LXVIII, p. 224.
5. CAMUS. — Recherches sur la fibrinolyse. *C. R. Acad. des Sciences*, 1901, t. CXXXII, p. 215.  
— Spécificité et conditions d'action des précipitines. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, p. 100.
6. DANYSZ. — Contribution à l'étude des propriétés et de la nature des mélanges toxines avec leurs antitoxines. *Annales I. Pasteur*, 1902, t. 26, p. 331.

7. H.-R. DEAN. — The Relation between the fixation of complement and the formation of a precipitate. *Zeitschr. f. Immunitätsf., I. Orig.*, t. XIII, pp. 84-122, 1913.
8. OSCAR DEMEES. — Précipitines et Précipitables. *La Cellule*, 1907, t. XXIV, pp. 315-352.
9. R. DOURIS et J. RICARDONI. — Sérums et Antisérums précipitants. *Bull. Sciences Pharmacol.*, 1924.
10. J. DUCLAUX. — *Les Colloïdes*. Gauthier, Villars et Cie, Paris, 1922.
11. ETIENNE-MARTIN et A. ROCHAIX. — Sur le « Phénomène paradoxal » dans la réaction d'Uhlenhüth. *Annales de Méd. légale*, janvier 1928, p. 47.
12. FLEISCHMANN et C. MICHAELIS. — *Biochem. Zeit.*, 1907, N° 3, p. 425.
13. FOURCADE et B. LE BOURDELLES. — Deux cas d'infection paratyphique à bacilles d'un type aberrant. *Archives I. Pasteur d'Algérie*, 1923, t. I, fasc. 1, pp. 4-7.
14. FREDERIC P. GAY. — The Fixation Reaction in Relation to the Formation of Specific Serum Precipitates. *Univ. California Public. in Pathol.*, 1911, t. II, pp. 1-22.
15. HOLKER. — The Properties of Syphilitic Sera in Relation to the Specificity of Immunity Reactions. *Journal of Pathol. and Bact.*, 1922, vol XXV, pp. 281-290.
16. B. A. HOUSSAY et J. NEGRETE. — Propedias precipitantes específicas de los sveros antiofidrios. *Revista del Instituto Bact.*, Buenos Aires, nov. 1917, t. I, pp. 3-19.
17. A. JOUSSET. — *Les Sérums antituberculeux. Précipito-diagnostic de la tuberculose*. C. R. Soc. Biol., t. LXVI, 18 déc. 1909, p. 708.
18. B. LE BOURDELLES et LIÉGEOIS. — Contribution à l'étude de la réaction de Henry (Ferro-et-Melano-Floculation). Sa valeur dans le diagnostic de l'infection palustre. *R. C. Soc. Biol (Soc. Lyon)*, 24 avril 1928, t. XCVIII, p. 154.

19. LINOSSIER et LEMOINE. — Sur les substances précipitantes des albumines (précipitines) contenues dans certains sérums spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, pp. 85-88.
20. MASSOL et GRYZEZ. — Antigènes et Anticorps typhiques. Réaction d'inhibition. *Bull. I. Pasteur*, 1913, p. 969.
21. LEONOR MICHAELIS. — Ueber Hemmungen der Praecipitinreaktion. *Beiträge zur chem. Physiol.*, 1903, t. IV, pp. 59-78.
22. Ch. MONDANI, DOURIS et BECK. — Au sujet du sérodiagnostic du Cancer : Les phénomènes de précipitation. *Annales I. Pasteur*, 1927, p. 1097.
23. R. MUIR et W. B. MARTIN (Glasgow). — On the deviation of complement by a serum and its antiserum, and its relations to the precipitation test. *Journal of Hyg.*, 1906, t. VI, p. 625.
24. M. NICOLLE, CESARI et DEBAINS. — Etudes sur la précipitation mutuelle des Anticorps et des Antigènes. Sérums « Antisérums ». *Ann. I. Pasteur*, 1920, t. XLI, p. 150.  
— Etudes sur la précipitation mutuelle des Anticorps et des Antigènes: sérums anti-toxiques. *Ann. I. Pasteur*, 1920, t. XCI, p. 596.
25. F. OBERMAYER et E. P. PICK. — Ueber den Einfluss physikalischer und chemischer Zustandsänderungen praecipitinogenen Substanzen auf die Bildung von Immünpraecipitinen. *Wien. Klin. Woche*, 1903, N° 22.
26. Eugène L. OPIE. — The relation of antigen to antibody (praecipitin) *in vitro*. *Journal Immun.*, 1923, VIII, pp. 19-34.
27. Julia T. PARKER. — Zone phenomena in complement fixation with « residue » antigens. *Journal Immun.*, 1923, VIII, pp. 223-228.
28. PANDIT. — *Journal of Hyg.*, 1923, N° 21, p. 406,

29. G. RAMON. — I. La Flocculation dans les mélanges de toxine et de sérum antidiphtérique. *Ann. I. Pasteur*, 1923, p. 1001.  
II. Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtérique. Pouvoir flocculant et propriétés immunisantes. *Ann. I. Pasteur*, 1924, t. XXXVIII, p. 1.
30. A. RODET. — Sur les sérums dits précipitants. Rôle respectif de l'un et de l'autre sérum dans la réaction de précipitation. *C. R. Soc. Biol.*, 7 avril 1906, t. LX, pp. 671-674.
31. SÉDALLIAN. — *Etudes sur les streptocoques hemolytiques pathogènes pour l'homme*. Thèse Lyon, 1925, p. 101.
32. Edmond SERGENT. — La fièvre méditerranéenne. *Revue d'Hygiène et de Police Sanitaire*, t. XXXII, N° 8 août et N° 9 sept. 1920, p. 821 et 930.
33. THJOTTA. — *Journal Imm.*, 1920, N° 5, p. 1.
34. H. VALLÉE (Alfort) et NICOLAS (Toulouse). — Les sérums précipitants. Leur spécificité, leur mode de préparation. *Bull. Soc. cent. Méd. Vét.*, 3<sup>e</sup> série, t. X, 1903, pp. 293-297.
35. Gidéon WELLS. — Les aspects chimiques de l'Immunité. Paris, Douin, 1928.
36. D. A. WELSH et H. G. CHAPMAN. — 1° On the Main Source of « Praecipitable », substance and on the Role of the Homologous Protein in Praecipitin Reactions. *Proc. of the Roy. Soc. Serie B.*, t. LXXVIII, 31 mai 1906, pp. 297-313.  
2° Praecipitin antisera and their standardisation. *Journ. of Hyg.*, 1906, t. VI, pp. 251-264.  
— On the Weight of Praecipitum obtainable in Praecipitin Interactions with Small Weights of Homologous Protein. *Proc. of the Roy. Soc., Serie B.*, t. LXXX, 1908, pp. 161-164.  
— Beitrag Zur Erklärung der Praecipitinreaktion. *Zeitschrift für Immunitäts, I Orig.*, t. IX, 1911, pp. 517-528.

37. R. DOURIS et R. BRICQ. — Sérodiagnostic de la syphilis. Méthode de Vernes, et Syphilimétrie. *Bull. Sciences Pharm.*, nov.-déc. 1918, t. XXV, p. 321.
38. F. WIDAL, A. LEMIERE et ABRAMI. — Mélange du sérum et des cultures typhiques. Méthode des dilutions *Nouveau Traité de Médecine*, 1921.
-

## TABLE DES MATIÈRES

---

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Chapitre Premier.</i> — Introduction.....                                                      | 9  |
| <i>Chapitre II.</i> — Le « Phénomène de Zone » dans<br>la Précipitation.....                      | 13 |
| <i>Chapitre III.</i> — Mécanisme du Phénomène de Zone<br>dans la Précipitation.....               | 27 |
| <i>Chapitre IV.</i> — Le Phénomène du Zone dans les<br>réactions autres que la Précipitation..... | 37 |
| Conclusions .....                                                                                 | 61 |
| Bibliographie.....                                                                                | 63 |

---



